

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①① N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 824 754**

②① N° d'enregistrement national : **01 06403**

⑤① Int Cl<sup>7</sup> : B 01 J 2/06, B 01 J 13/12, 3/00, A 61 K 9/16

①②

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

**A1**

②② Date de dépôt : 15.05.01.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 22.11.02 Bulletin 02/47.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *SEPAREX Société anonyme* — FR.

⑦② Inventeur(s) : PERRUT MICHEL, JUNG JENNIFER  
et LEBOEUF FABRICE.

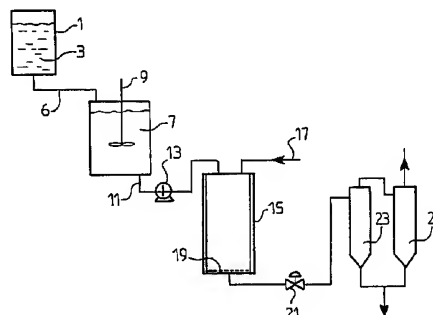
⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET GUIU ET BRUDER.

⑤④ PROCÉDE D'OBTENTION DE PARTICULES SOLIDES A PARTIR D'AU MOINS UN PRODUIT  
HYDROSOLUBLE.

⑤⑦ La présente invention concerne un procédé d'obten-  
tion de particules solides à partir d'au moins un produit hy-  
drosoluble.

Ce procédé est caractérisé en ce qu'il comporte les éta-  
pes consistant à mettre en solution ledit produit au sein  
d'une phase aqueuse, réaliser une émulsion, ou une micro-  
émulsion, constituée de ce mélange aqueux et d'une phase  
organique polaire, mettre en contact cette émulsion, ou cet-  
te micro-émulsion, avec un fluide à pression supercritique,  
ou un gaz liquéfié, de façon que celui-ci extrait la phase or-  
ganique et l'eau, provoquant ainsi la précipitation de parti-  
cules solides constituées du produit hydrosoluble, et  
recueillir les particules ainsi formées.



FR 2 824 754 - A1



La présente invention concerne un procédé destiné à la production de fines particules solides à partir d'un produit hydrosoluble.

On sait que de nombreuses industries utilisent des solides sous forme pulvérulente et ces poudres se présentent soit sous forme de particules simples constituées uniquement d'un seul composant, soit sous forme de particules complexes constituées soit d'un principe actif dispersé au sein d'un revêtement adapté, soit d'un cœur en une certaine matière et d'un revêtement en une autre matière.

L'industrie pharmaceutique, mais également l'industrie des cosmétiques et l'agrochimie, requièrent de nouvelles formulations afin d'améliorer l'efficacité de certaines molécules d'intérêt thérapeutique, dermatologique ou phytosanitaire. Ainsi, on cherche les moyens d'augmenter la solubilité dans les milieux biologiques de principes actifs insolubles ou très peu solubles, afin d'augmenter leur bio-disponibilité, de diminuer les doses administrées et donc de réduire les effets secondaires. De même, il est parfois intéressant d'obtenir une dissolution contrôlée au sein des tissus ou des fluides biologiques tels que le sang ou la lymphe. Pour ce faire, on utilise alors préférentiellement soit des formes très dispersées des principes actifs ayant une vitesse de dissolution beaucoup plus rapide que les poudres usuelles, soit des micro-capsules de type dit à structure matricielle, appelées parfois également micro-

sphères, qui sont constituées d'un mélange aussi homogène que possible des particules de principe actif au sein d'un excipient. Idéalement, le principe actif est littéralement dissous au sein de l'excipient.

5        On cherche également à éviter la perte d'activité biologique qui est due aux problèmes d'instabilité dans les milieux aqueux ou pendant le stockage en présence de l'oxygène, de l'humidité de l'air ou de la lumière, ou encore à réaliser une protection efficace de certaines  
10        molécules qui seraient détruites dès leur absorption par les enzymes digestifs. Différents excipients sont utilisés en vue de résoudre ces problèmes, sans toutefois permettre de proposer des solutions satisfaisantes dans de nombreux cas. Les micro-capsules constituées d'un « coeur » et d'une  
15        « écorce » répondent bien à ce besoin, et les micro-sphères à structure matricielle peuvent également être employées à cette fin.

      L'intérêt de ces structures est tel que de nombreux procédés d'obtention ont été décrits et sont, pour  
20        certains, en cours d'exploitation industrielle. Toutefois, on notera qu'il est particulièrement difficile de fabriquer de telles poudres très fines, de telles micro-sphères ou micro-capsules à partir de bio-molécules et particulièrement de protéines d'intérêt thérapeutique, en  
25        raison de la grande fragilité de ces produits dont la dénaturation est irréversible. On sait, en effet, qu'à la différence des produits chimiques ou biologiques

classiques, les protéines sont des édifices complexes et fragiles dont l'activité biologique est étroitement liée à la conformation tridimensionnelle qui peut être affectée par l'environnement de la molécule, ce qui entraîne une  
5 destruction généralement irréversible de son activité biologique. Cette fragilité est particulièrement grande pour de nombreuses protéines de haut intérêt thérapeutique dont la production commence à être mise en œuvre selon les nouvelles biotechnologies, mais dont la mise en œuvre  
10 thérapeutique s'avère extrêmement délicate

Il est connu dans l'état antérieur de la technique que les fluides supercritiques, et particulièrement le dioxyde de carbone supercritique, sont largement utilisés en vue de réaliser des poudres très fines qui sont susceptibles de se  
15 dissoudre très rapidement ou d'être utilisables par ingestion par les voies respiratoires. Les fluides supercritiques sont également utilisés en vue d'obtenir des particules complexes consistant en des mélanges de différentes morphologies du principe actif et d'un  
20 excipient, telles que les micro-sphères ou les micro-capsules.

On rappellera tout d'abord les différents états d'un fluide et ses propriétés dans chacun de ces états. On sait que les corps sont généralement connus sous trois états, à  
25 savoir solide, liquide ou gazeux et que l'on passe de l'un à l'autre en faisant varier la température et/ou la pression. Outre l'état solide, il existe l'état liquide et

l'état gazeux séparés par la courbe de vaporisation/condensation, mais on sait qu'il existe un point au-delà duquel on peut passer de façon continue de l'état liquide à l'état de gaz ou de vapeur sans passer par une ébullition ou à l'inverse par une condensation. Ce point est appelé le point critique PC.

L'état supercritique est caractérisé soit par une pression et une température respectivement supérieures à la pression et à la température critiques dans le cas d'un corps pur, soit par un point représentatif (pression, température) situé au-delà de l'enveloppe des points critiques représentés sur un diagramme (pression, température) dans le cas d'un mélange. Il présente alors, à l'égard de très nombreuses substances, un pouvoir solvant élevé, sans commune mesure avec celui qu'il possède à l'égard de ce même fluide lorsqu'il se trouve à l'état de gaz comprimé.

Il en est de même des liquides dits "sub-critiques", c'est-à-dire des liquides qui se trouvent dans un état caractérisé soit par une pression supérieure à la pression critique et par une température inférieure à la température critique dans le cas d'un corps pur, soit par une pression supérieure aux pressions critiques et une température inférieure aux températures critiques des composants dans le cas d'un mélange (voir à ce sujet l'article de Michel PERRUT - Les Techniques de l'Ingénieur « Extraction par fluide supercritique, J 2 770 - 1 à 12, 1999 »). On peut

également utiliser un gaz liquéfié, c'est-à-dire un fluide gazeux dans les conditions de pression atmosphérique et de température voisines de l'ambiante, maintenu à l'état liquide à une température inférieure à sa température critique et, à fortiori, à sa température d'ébullition à la pression considérée. Les variations importantes et modulables du pouvoir solvant des fluides à pression supercritique et des gaz liquéfiés sont d'ailleurs utilisées dans de nombreux procédés d'extraction (solide/fluide), de fractionnement (liquide/fluide), de chromatographie analytique ou préparative, de traitement des matériaux (céramiques, polymères) et de génération de particules. Des réactions chimiques ou biochimiques sont également réalisées dans de tels solvants.

Il est à noter que les propriétés physico-chimiques du dioxyde de carbone ainsi que ses paramètres critiques (pression critique : 7,4 MPa et température critique : 31°C) en font le solvant préféré dans de nombreuses applications, d'autant qu'il ne présente pas de toxicité et qu'il est disponible à très bas prix en très grande quantité. D'autres fluides peuvent également être utilisés dans des conditions voisines, comme le protoxyde d'azote, les hydrocarbures légers ayant deux à quatre atomes de carbone, et certains hydrocarbures halogénés.

On notera que l'eau est en général très peu soluble dans les fluides à pression supercritique et les gaz liquéfiés classiquement utilisés, et en particulier dans le

dioxyde de carbone sous haute pression au sein duquel l'eau n'est soluble qu'à raison de 1 à 3 g/kg entre 25°C et 50°C. Ceci conduit à une importante limitation dans l'application des procédés visant à obtenir des particules lorsque les produits à traiter ne peuvent être mis en solution que dans des milieux aqueux, tels que les bio-molécules et particulièrement les protéines et les peptides.

On notera également que, par contre, l'eau peut être mise en solution dans le dioxyde de carbone, à des concentrations significatives atteignant plusieurs dizaines de grammes par kilogramme lorsque le dioxyde de carbone est additionné d'un co-solvant polaire qui va jouer le rôle d'entraîneur de l'eau. On utilise ainsi principalement à cette fin les alcools et plus particulièrement l'éthanol.

Dans la suite, et par commodité de langage, on appellera fluide à pression supercritique un fluide porté à une pression supérieure à sa pression critique, c'est-à-dire soit un fluide supercritique proprement dit, soit un liquide dit sub-critique comme défini ci-dessus. De même, on appellera gaz liquéfié un liquide constitué d'un composé qui se trouve à l'état gazeux à pression atmosphérique et à température ambiante, qui est porté à une température inférieure à sa température d'ébullition à la pression considérée.

D'après des dizaines de publications scientifiques et de brevets, on sait que l'on peut obtenir des micro-particules, d'une granulométrie généralement comprise entre

1  $\mu\text{m}$  et 10  $\mu\text{m}$ , et des nano-particules d'une granulométrie  
généralement comprise entre 0,1  $\mu\text{m}$  et 1  $\mu\text{m}$ , en utilisant  
des procédés mettant en œuvre les fluides supercritiques,  
tels que le procédé connu sous la dénomination de RESS  
5 consistant à détendre très rapidement à basse pression une  
solution du produit à atomiser dans un fluide  
supercritique, ou le procédé anti-solvant connu sous  
différentes dénominations SAS, SEDS, PCA, ASES consistant à  
pulvériser une solution du produit à atomiser dans un  
10 solvant organique ou aqueux au sein d'un courant de fluide  
en état supercritique.

Ces procédés permettent d'obtenir une poudre de  
particules très fines dispersées au sein d'un courant  
gazeux à faible pression (procédé RESS), ainsi que décrit  
15 par exemple dans le brevet US-A-4,582,731, ou à pression  
élevée (procédé SAS) ainsi que décrit par exemple dans les  
brevets US-A-5,707,634, EP-A-0 322 687 et US-A-5,043,280.

L'homme du métier sait toutefois que le procédé RESS  
n'est pas applicable à la plupart des molécules solubles  
20 dans l'eau, comme les bio-molécules, car elles ne sont pas  
du tout solubles dans les fluides à pression supercritique  
et dans les gaz liquéfiés. De même, les procédés de type  
anti-solvant sont adaptés au traitement de principes actifs  
solubles dans les solvants organiques, et ne peuvent être  
25 que difficilement mis en oeuvre lorsque le produit à  
traiter ne peut être dissous que dans de l'eau. En effet,  
l'eau étant quasiment insoluble dans les fluides à pression



supercritique et dans les gaz liquéfiés, on doit alors impérativement utiliser un fluide anti-solvant constitué d'un fluide à pression supercritique ou d'un gaz liquéfié additionné d'un co-solvant polaire, généralement un alcool, 5 qui va jouer le rôle d'entraîneur et permettre l'élimination de l'eau par le fluide, ceci au prix d'une grande complexité et d'un coût de traitement très élevé.

Il en est de même des procédés décrits dans le brevet US-A-5,639,441, selon lesquels une solution aqueuse du 10 produit est mise en contact avec un fluide à pression supercritique puis est rapidement décomprimée à la pression atmosphérique, générant un aérosol de gouttelettes de solution aqueuse du produit qui vont donner naissance à une poudre sèche lors de l'élimination de l'eau de ce fluide. 15 En fait, ce procédé est du type séchage par atomisation, généralement nommé spray-drying, requérant un apport important de chaleur pour faire passer l'eau de la phase liquide à la phase gazeuse puisque le fluide ainsi décomprimé ne présente aucun pouvoir solvant vis-à-vis de 20 l'eau.

On notera que les résultats expérimentaux présentés à ce jour n'ont été obtenus qu'à l'échelle du laboratoire où les transferts de chaleur sont très faciles à mettre en œuvre puisque les flux de chaleur requis sont infimes, 25 alors qu'au contraire, de réelles difficultés de mise en œuvre apparaissent lors de la mise en oeuvre à l'échelle industrielle, le procédé ainsi décrit ne paraissant pas

alors apporter une amélioration significative par rapport au procédé classique de séchage par atomisation dont on connaît bien les limites dès lors qu'il s'agit d'élaborer des poudres fines de bio-molécules thermo-sensibles.

5 Dans un article récent (H. Zhang, J. Lu, B. Han, "Precipitation of lysozyme solubilized in reverse micelles by dissolved CO<sub>2</sub>", Journal of Supercritical Fluids, 20, 2001, p. 65-71), on a décrit le principe d'une méthode originale d'obtention de poudre de protéine à partir d'une  
10 solution micellaire inverse de cette protéine au sein d'un solvant organique, fondée sur la précipitation sélective de la protéine par contact de la solution micellaire avec du dioxyde de carbone sous pression, l'eau restant en solution micellaire dans le solvant considéré. Outre le fait que cet  
15 article ne décrit qu'un principe et non un procédé de mise en oeuvre de ce principe, on notera que la poudre de protéine ainsi préparée serait imprégnée d'eau résiduelle et de solvant organique, rendant son utilisation ultérieure problématique, sauf à lui faire subir un traitement de  
20 purification ultérieur.

Plusieurs procédés visant à générer des micro-sphères selon le principe anti-solvant, particulièrement les brevets EP-A-0 322 687 et US-A-5,043,280, ou des micro-capsules en utilisant un fluide à pression supercritique,  
25 un gaz comprimé ou un gaz liquéfié, ont été décrits dans les brevets et demandes de brevet EP-A-0 322 687, WO-95/01221, WO-96/00610, EP-A-0 706 821, FR-A-2 753 639, FR-

00.00185, EP-A-0 744 992, WO-98/15348 et FR-00.13393. Les brevets EP-A-0 322 687 et US-A-5,043,280, décrivent une famille de procédés permettant de préparer des microsphères en mettant en contact une solution liquide du principe actif et de l'excipient avec un fluide supercritique, appliquant sans le nommer, le concept anti-solvant. On notera que ces brevets ne revendiquent pas la préparation de particules de produits purs, mais uniquement la préparation de particules complexes de type microsphères.

Un autre procédé, décrit dans les brevets EP-A-0 706 821 et WO 98/15348, repose sur la mise en solution de l'agent de revêtement dans le fluide à pression supercritique. L'homme du métier sait que la plupart des revêtements utilisés pour la mise en forme de microcapsules sont insolubles dans de tels fluides, ce qui limite considérablement la portée pratique de ce procédé.

A fortiori, le procédé décrit dans plusieurs articles de l'équipe de P. Debenedetti, (dont par exemple on citera : P. Debenedetti, J.W. Tom, S.D. Yeo, G.B. Lim "Application of Supercritical Fluids for the Production of Sustained Delivery Devices", *Journal of Controlled Release*, 24, 1993, 27-44), consistant à pulvériser une solution de l'agent de revêtement et du principe actif dans le fluide à pression supercritique connaît-il des applications encore beaucoup plus limitées.

Afin d'éviter ces limitations, plusieurs brevets, dont les brevets et demandes de brevet EP-A-0 322 687, WO 95/01221 et WO 96/00610, décrivent l'élaboration de micro-capsules ou de micro-sphères selon le concept du procédé anti-solvant. Ce procédé implique la mise en solution de l'agent de revêtement et du principe actif dans un ou plusieurs solvants organiques ou aqueux, dont la nécessaire dissolution dans le fluide à pression supercritique va impliquer de façon incontournable l'utilisation d'au moins un solvant ou co-solvant organique, avec les inconvénients que cela comporte : Problèmes importants de récupération du solvant et de purification des micro-capsules obtenues, difficulté, sinon impossibilité de réaliser l'encapsulation de bio-molécules comme les protéines, dont la plupart sont irréversiblement dénaturées au contact d'un solvant organique.

Un autre procédé, décrit dans le brevet FR-A-2 753 639, consiste à réaliser la coacervation de l'agent de revêtement initialement dissous dans un solvant organique au sein duquel sont maintenues en dispersion les particules à revêtir, ladite coacervation étant provoquée par un effet anti-solvant causé par la dissolution d'un fluide supercritique ou d'un gaz liquéfié dans ledit solvant organique. La récupération des capsules obtenues est effectuée après extraction complète du solvant organique par un courant de fluide supercritique ou de gaz liquéfié, puis décompression du récipient dans lequel a été effectué

l'encapsulation. Ce procédé présente donc également l'inconvénient de nécessiter la mise en œuvre d'un solvant organique au sein duquel les particules d'agent actif seront dispersées.

5 Il en est de même pour la mise en œuvre de certaines revendications de la demande de brevet français N°00.00185 décrivant un procédé de captation et d'encapsulation de particules fines générées par un procédé mettant en œuvre un fluide à pression supercritique, selon lequel on capte  
10 les dites particules en lavant le fluide au sein duquel elles ont été générées par une solution d'un agent de revêtement qui va précipiter sur les particules et constituer des micro-capsules du fait de la sursaturation en agent de revêtement de la dite solution, causée par  
15 l'interaction entre la dite solution et le fluide transportant les particules. Tel n'est pas le cas de certaines dispositions de la demande de brevet français déjà citée N°00.00185, lorsque l'agent de revêtement est dissous dans l'eau, ce qui est toutefois rarement possible  
20 à mettre en œuvre.

Un procédé très différent est décrit dans le brevet européen EP-A-0 744 992, selon un concept généralement dénommé «PGSS» ("Particules obtenues à partir de Solutions Saturées en Gaz"). Ce procédé consiste à dissoudre un  
25 fluide compressible dans la substance à pulvériser jusqu'à la formation d'une solution saturée en fluide, puis à décompresser cette solution de telle façon que, d'une part,

elle soit pulvérisée en fines gouttelettes et, d'autre part, le refroidissement résultant de cette décompression induise la solidification de la substance initiale sous forme de fines particules solides. Ce brevet revendique également la production de micro-sphères constituées d'un mélange homogène de deux ou plusieurs composés qui sont initialement mélangés sous forme d'une solution homogène.

De façon très voisine, certaines dispositions de la demande de brevet WO-98/15348 décrivent l'application du concept précédent à la fabrication de micro-capsules constituées de particules d'un agent actif qui sont encapsulées dans un polymère, en utilisant un fluide à pression supercritique qui, en se dissolvant dans le polymère, le liquéfie à une température inférieure à la température de fusion du polymère et permet la mise en suspension des particules de l'agent actif au sein de cette phase liquide saturée elle-même en fluide supercritique. Cette suspension est ensuite détendue à pression atmosphérique avec formation de micro-capsules du fait de la solidification du polymère autour des particules d'agent actif.

On citera également le brevet américain US-A-5,399,597, qui décrit un procédé de production de peinture en poudre selon lequel on réalise, dans un premier récipient agité mécaniquement, un mélange comprenant un polymère, un agent de réticulation et éventuellement d'autres composants entrant dans la composition habituelle

d'une peinture (pigments, charges) avec du dioxyde de carbone à l'état supercritique, ce mélange étant porté à une température et à une pression adéquates afin que l'on obtienne, après détente partielle ou totale de ce mélange  
5 dans un second récipient maintenu à une pression nettement inférieure à celle du premier, une poudre solide constituée d'un mélange intime des différents constituants solides initiaux. Ces particules sont donc d'une structure voisine de celle des micro-sphères définies ci-dessus. On notera  
10 que ce procédé utilise du dioxyde de carbone à pression supercritique et que la température de mise en œuvre du mélange dans le premier récipient est généralement voisine de celle de fusion ou de transition vitreuse du polymère.

La demande de brevet français N°00.09437 décrit quant  
15 à elle la préparation de micro-capsules de principe actif dans un fluide comprimé à une pression inférieure à sa pression critique qui, se dissolvant dans l'excipient, va permettre de réaliser une suspension homogène de fines particules de principe actif, laquelle suspension sera  
20 ensuite pulvérisée par détente rapide.

La présente invention a pour but de proposer un procédé permettant d'élaborer des poudres très fines, des micro-sphères ou des micro-capsules, d'un diamètre généralement inférieur à 50  $\mu\text{m}$ , et souvent inférieur à 20  
25  $\mu\text{m}$  à partir notamment de biomolécules et notamment de protéines.

La présente invention a ainsi pour objet un procédé d'obtention de particules solides à partir d'au moins un produit hydrosoluble, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes consistant à :

- 5        - mettre en solution ledit produit au sein d'une phase aqueuse,
- réaliser une émulsion, ou une micro-émulsion, constituée de ce mélange aqueux et d'une phase organique polaire,
- 10       - mettre en contact cette émulsion, ou cette micro-émulsion, avec un fluide à pression supercritique, ou un gaz liquéfié, de façon que celui-ci extrait la phase organique et l'eau, provoquant ainsi la précipitation de particules solides constituées du produit hydrosoluble,
- 15       - recueillir les particules ainsi formées.

Dans une variante particulièrement intéressante de l'invention la phase aqueuse et/ou la phase organique pourra contenir au moins un agent de revêtement. Cet agent de revêtement pourra être constitué d'au moins un lipide du type utilisé dans les industries pharmaceutiques ou cosmétiques ou d'au moins un polymère du type utilisé dans les industries pharmaceutiques ou cosmétiques.

Outre le dioxyde de carbone qui est préféré dans de nombreuses applications le fluide à pression supercritique, 25 ou le gaz liquéfié, pourra être également du protoxyde d'azote ou du diméthyléther ou un mélange de ces gaz. Le solvant organique polaire pourra quant à lui être un alcool



ayant entre 3 et 10 atomes de carbone, et de préférence entre 4 et 7 atomes de carbone, ou un ester formé à partir d'un acide carboxylique et d'un alcool ayant au total entre 5 et 12 atomes de carbone, ou une cétone ayant entre 5 et 8 atomes de carbone.

Le procédé pourra être mis en oeuvre en réalisant:

- une alimentation en continu dans une enceinte, d'une part du fluide à pression supercritique ou du gaz liquéfié et, d'autre part, de l'émulsion ou de la micro-émulsion et,
- 10 - un soutirage en continu de cette enceinte du fluide contenant les particules.

Dans une variante particulièrement intéressante si l'on souhaite élaborer des particules de très faible diamètre, inférieur à 1  $\mu\text{m}$ , dans la seconde étape de l'un des procédés décrits ci-dessus, on préparera une micro-émulsion de la solution aqueuse au sein de la phase organique selon les techniques classiquement utilisées. La taille des globules de phase aqueuse étant très faible dans une telle micro-émulsion, il en résultera la génération de particules beaucoup plus fines que lorsque l'on traite une émulsion classique.

Dans une autre variante de l'invention, on préparera une émulsion double de type huile/eau/huile, toujours en vue d'obtenir une très grande dispersion de la phase aqueuse lors de la mise en contact avec le fluide à pression supercritique ou le gaz liquéfié, de façon à générer des particules de très faible diamètre.

Cette invention est particulièrement intéressante lorsque l'on souhaite obtenir des poudres fines de bio-molécules et particulièrement de protéines, ou préparer des micro-capsules ou des micro-sphères incorporant ces bio-  
5 molécules.

A la différence des procédés de l'état antérieur de la technique la présente invention permet d'utiliser une large variété d'agents actifs et d'excipients hydrosolubles, et d'agents de revêtement. De plus elle permet d'obtenir  
10 facilement des particules stériles dès lors que la solution aqueuse initiale est stérile et que la récupération des particules se fait selon les règles habituelles de stérilité, le procédé lui-même étant intrinsèquement stérile et n'augmentant en rien la charge biologique des  
15 produits mis en œuvre. De plus le dioxyde de carbone sous pression étant un biocide il ne peut, lorsqu'il est utilisé selon la présente invention, que faciliter la stérilité de l'opération, voire détruire les micro-organismes éventuellement présents dans les fluides de façon  
20 accidentelle.

Ces avantages prennent tout leur sens lorsqu'on considère l'atomisation de bio-molécules et particulièrement de protéines, que l'on peut ainsi obtenir sous forme de poudre sèche micronisée, à partir d'une  
25 solution aqueuse en présence d'agents de stabilisation. Ces protéines, mélangées à des agents de stabilisation, ne peuvent en effet être mises en solution au sein d'un

solvant organique comme décrit dans les brevets US-A-5,707,634, EP-A-0 322 687 et US-A-5,043,280.

Selon l'invention, le principe actif est mis en solution aqueuse, éventuellement en présence des agents de stabilisation requis pour assurer une bonne stabilité de la molécule et de sa conformation tridimensionnelle. Cette phase aqueuse est ensuite additionnée à un solvant organique polaire choisi pour permettre d'obtenir facilement une émulsion qui, si besoin est, pourra être stabilisée en additionnant un ou plusieurs agent(s) tensioactif(s) choisi(s) en fonction de la nature du solvant organique polaire utilisé, selon les connaissances bien établies en la matière et en respectant les contraintes éventuelles liées à l'utilisation du produit, en particulier en matière de toxicité et de réglementation. Cette émulsion est ensuite mise en contact avec un fluide à pression supercritique ou un gaz liquéfié qui va extraire le solvant organique et l'eau du fait de l'effet d'entraînement lié à la présence de ce solvant dissous dans le fluide. C'est pourquoi il convient de doser l'émulsion de façon à ce que l'eau puisse être entièrement entraînée par le fluide en présence du solvant organique utilisé. Préférentiellement, la masse de phase aqueuse mise en émulsion sera comprise entre 1% et 30% de la masse du solvant organique c'est pourquoi on choisira alors de mettre en oeuvre une émulsion eau/huile. On obtiendra ainsi une poudre sèche constituée de particules du produit accompagné

éventuellement des agents de stabilisation présents dans la phase aqueuse, et de traces de tensioactif s'il a été utilisé pour stabiliser l'émulsion.

On comprendra que le choix du solvant organique est de première importance puisqu'il doit à la fois permettre de réaliser une émulsion stable avec une phase aqueuse, être très soluble dans le fluide à pression supercritique ou le gaz liquéfié et jouer le rôle de co-solvant entraîneur pour permettre l'extraction de l'eau. De plus, il ne doit pas présenter de risques de toxicité inacceptables bien que le procédé selon l'invention permette de réduire la concentration résiduelle de ce solvant dans les particules obtenues à des niveaux très bas et acceptables pour la plupart des solvants dans les applications pharmaceutiques, cosmétiques ou vétérinaires. De nombreux solvants présentent ces propriétés, et il se trouve que certains alcools, esters et cétones répondent particulièrement bien à ces critères. On citera ainsi de façon non limitative les alcools ayant entre 3 et 10 atomes de carbone, de préférence entre 4 et 7 atomes de carbone, les esters formés à partir d'acides carboxyliques et d'alcools ayant au total entre 5 et 12 atomes de carbone, des cétones ayant entre 5 et 8 atomes de carbone.

On décrira ci-après, à titre d'exemple non limitatif, diverses formes d'exécution de la présente invention, en référence au dessin annexé sur lequel :

La figure 1 est une vue schématique d'une installation permettant de mettre en œuvre le procédé suivant l'invention.

La figure 2 est une vue schématique d'une variante de mise en œuvre de l'installation représentée sur la figure 1.

La figure 3 est une photographie d'une particule de BSA ("Albumine Sérique Bovine") obtenue par le procédé suivant l'invention.

La figure 4 est une photographie d'une particule de BSA stabilisée au mannitol obtenue par le procédé suivant l'invention.

La figure 5 est un graphique représentant la courbe de relargage en fonction du temps d'une protéine.

La figure 6 est une photographie d'une particule de valine obtenue par le procédé suivant l'invention.

On a représenté sur la figure 1 une installation permettant de mettre en œuvre le procédé suivant l'invention. Cette installation comprend un bac de mélange 1 contenant de l'eau 3 dans laquelle on dissout l'agent actif de façon à mettre celui-ci en solution. Le bac 1 communique par une conduite 6 avec un bac mélangeur 7 qui contient un solvant organique, éventuellement stabilisé par l'ajout d'un tensioactif approprié. On amène la solution de principe actif dans le bac 7 et l'ensemble est mis en émulsion au moyen d'un agitateur 9. Le contenu du bac mélangeur 7 est amené par une conduite 11 et une pompe 13

dans un réacteur 15 sous pression qui reçoit par ailleurs, par une conduite 17 un fluide à pression supercritique ou un gaz liquéfié. Ce fluide, porté à la température et à la pression désirée, extrait rapidement le solvant et l'eau  
5 contenus dans l'émulsion et provoque la précipitation de l'agent actif sous forme de particules qui sont entraînées par le courant de fluide d'où elles peuvent être collectées sur un filtre 19, qui est disposé dans le fond du réacteur 15 et au travers duquel percole le fluide sortant de celui-  
10 ci. Selon la technique connue dans le domaine de l'extraction par fluide à pression supercritique, le courant de fluide chargé en solvant organique et en eau est ensuite détendu dans une vanne 21 et la phase liquide constituée de solvant organique et d'eau est collectée dans  
15 des séparateurs 23 et 25, le gaz comprimé ainsi débarrassé de cette phase liquide étant ensuite recyclé.

Dans une variante de l'invention particulièrement intéressante sur le plan économique, et qui est représentée de façon schématique sur la figure 2, on utilise un  
20 réacteur 15' à fond conique dépourvu de filtre, et on dirige le flux de fluide chargé en particules vers l'un ou l'autre de deux récipients de collecte 27 ou 29 qui sont chacun pourvus d'un panier 31, 33 fermé à sa base par un élément de filtration. On peut ainsi alimenter en continu  
25 l'enceinte 15' avec le fluide à pression supercritique ou le gaz liquéfié d'une part, et avec l'émulsion d'autre part, soutirer en continu le fluide chargé en particules et

collecter ces dernières sur l'un des éléments de filtration pendant que l'on récupère les particules déjà collectées sur l'autre élément, ceci après dépressurisation et ouverture du récipient de collecte ou encore selon un  
5 procédé comme celui décrit dans la demande de brevet français N°99.15832.

#### EXEMPLES DE MISE EN ŒUVRE

Des exemples de mise en œuvre sont présentés ci-après  
10 afin d'illustrer le procédé selon l'invention.

On a utilisé pour leur mise en œuvre l'équipement de génération de particules et de collecte des micro-capsules représenté sur la figure 1 qui était d'une taille pilote. Il utilisait du dioxyde de carbone à une pression de  
15 service de 30 MPa et une gamme de température allant de 0°C à 80 °C. Le réacteur 15 sous pression était de forme cylindrique, d'un diamètre de 0,10 m et d'un volume total de 4 litres. Il comportait une double enveloppe parcourue par un fluide caloporteur permettant de maintenir la  
20 température de l'ensemble à la valeur désirée. Ce réacteur comportait un panier constitué d'un cylindre d'un diamètre extérieur de 9,2 cm, qui était ouvert à sa partie supérieure et fermé à sa partie inférieure par un filtre 19 constitué d'un disque en métal fritté recouvert d'une  
25 membrane filtrante en fibres de verre d'une porosité de 1  $\mu$ m. Le fluide a été introduit par un orifice disposé sur une bride à la partie supérieure du réacteur 15. Les

séparateurs 23 et 25 étaient constitués de chambres cycloniques d'un volume de 200 mL.

#### Exemple 1

Au moyen de l'équipement ainsi décrit on a réalisé des  
5 particules très fines d'albumine de type BSA ("Albumine Sérique Bovine").

Pour ce faire on a préparé une solution de BSA dans de l'eau déminéralisée à 40 mg/mL de BSA. L'émulsion a été réalisée à pression atmosphérique à 20°C par agitation  
10 rapide d'un mélange de 20 mL de cette solution, de 80 mL de n-pentanol et 1 g de tensioactif constitué de « Tween 80 » (oléate de polyoxyéthylènesorbitanne). Cette émulsion a ensuite été introduite dans le réacteur 15 à raison de 3 mL/min, au travers d'une buse de 500 µm de diamètre dans un  
15 flux de 15 kg/h de dioxyde de carbone porté à une pression de 20 MPa et à 40°C. En fin d'opération, on a collecté 0,7 g d'une poudre sèche de couleur légèrement jaune dont un échantillon a été observé dans un microscope électronique à balayage comme représenté sur la photo de la figure 3. On  
20 constate ainsi que les particules obtenues sont sphériques, légèrement agglomérées avec une répartition granulométrique comprise entre 0,5 µm et 3 µm.

#### Exemple 2

L'essai réalisé à l'exemple 1 a été reproduit dans des  
25 conditions voisines, à la différence que l'on a utilisé du mannitol pour stabiliser la protéine.



On a ainsi préparé une solution dans de l'eau déminéralisée à 36 mg/mL de BSA et à 4 mg/mL de mannitol. L'émulsion a été réalisée à pression atmosphérique à 20°C, par agitation rapide d'un mélange de 20 mL de cette  
5 solution, de 80 mL de n-pentanol et 1g de tensioactif constitué de « Tween 80 ». La mise en contact avec le dioxyde de carbone a été réalisée ainsi que décrit précédemment. En fin d'opération, on a collecté 0,65 g d'une poudre sèche de couleur légèrement jaune dont un  
10 échantillon a été observé dans un microscope électronique à balayage comme représenté sur la photo de la figure 4. On a constaté que les particules ainsi obtenues sont sphériques, peu agglomérées, et la plupart ont un diamètre compris entre 0,5 et 3  $\mu\text{m}$ .

15 De plus, l'analyse par chromatographie en phase gazeuse de la teneur en pentanol des particules composant cette poudre a conduit à une teneur de 0,1 % en masse.

### Exemple 3

L'essai réalisé à l'exemple 1 a été reproduit dans des  
20 conditions voisines, à la différence l'on a dissous dans le solvant organique un agent de revêtement appelé « Eudragit L100 », constitué d'un polymère acrylique fréquemment utilisé comme excipient pharmaceutique. On a préparé une solution dans le n-pentanol de 10 mg/mL d'«Eudragit L100»  
25 et procédé comme dans l'exemple 1. En fin d'opération, on a obtenu une poudre blanche non agglomérée constituée de particules d'un diamètre compris entre 1  $\mu\text{m}$  et 5  $\mu\text{m}$ .

Des mesures relatives à la mise en solution de la protéine dans un tampon pH 4 ont été conduites à 37 °C avec suivi de la concentration dans l'eau par spectrophotométrie UV. La courbe de relargage de la protéine en fonction du temps est présentée sur la figure 5, montrant que la protéine a été effectivement encapsulée au sein de l'agent de revêtement sans effet de relargage immédiat lors de la mise en contact avec la phase aqueuse. Au contraire, on a assisté à un relargage progressif très régulier de la protéine pendant 32 heures.

#### Exemple 4 :

L'essai réalisé à l'exemple 1 a été reproduit dans des conditions voisines en utilisant une protéine appelée lactase.

En fin d'opération, on a collecté 0,67 g de poudre fine jaunâtre. Des mesures relatives à l'activité biologique de la protéine ont été conduites selon le protocole généralement utilisé pour la mesure de l'activité enzymatique des lactases. La réaction mise en oeuvre est l'hydrolyse de l'O-nitrophenyl-galactopyranoside (ONPG) en O-nitrophénol et D-galactose, la production de l'O-nitrophénol étant suivie par spectrophotométrie à 420 nm. La comparaison des activités de la protéine avant et après traitement n'ont pas fait apparaître de variations significatives, montrant ainsi que le procédé n'altère pas l'activité biologique de celle-ci.

Exemple 5

L'essai réalisé à l'exemple 1 a été reproduit dans les mêmes conditions en utilisant un acide aminé, à savoir la valine.

5 On a préparé une solution dans l'eau déminéralisée à 60 mg/mL de valine. L'émulsion a été réalisée à pression atmosphérique à 20°C par agitation rapide d'un mélange de 20 mL de cette solution, de 80 mL de n-pentanol et 1g de tensioactif constitué de « Tween 80 ». La mise en contact  
10 avec le dioxyde de carbone a été effectuée dans les mêmes conditions que précédemment. En fin d'opération, on a collecté 1,02 g d'une poudre sèche de couleur blanche dont un échantillon a été observé dans un microscope électronique à balayage comme représenté sur la  
15 photographie de la figure 6. On a constaté ainsi que les particules obtenues sont des cristaux agglomérés, la plupart ayant un diamètre de l'ordre de quelques microns.

De plus, l'analyse par chromatographie, en phase gazeuse de la teneur en n-pentanol des particules composant  
20 cette poudre a conduit à une teneur de 0,1 % en masse.

Exemple 6

L'essai réalisé à l'exemple 1 a été reproduit dans les mêmes conditions en utilisant un sucre, à savoir le sorbitol.

25 On a ainsi préparé une solution dans l'eau déminéralisée à 250 mg/mL de « SORBITOL ». L'émulsion a été obtenue à pression atmosphérique à 20°C par agitation

rapide d'un mélange de 10 mL de cette solution, de 90 mL de n-butanol et 1g de tensioactif constitué de « Tween 80 ». La mise en contact avec le dioxyde de carbone a été effectuée dans les mêmes conditions que précédemment. En 5 fin d'opération, on a collecté 2,1 g d'une poudre sèche de couleur blanche dont un échantillon a été observé dans un microscope électronique à balayage. On a constaté que les particules obtenues étaient des fibrilles dont la plupart possédaient un diamètre de l'ordre de 1  $\mu\text{m}$  et une longueur 10 de l'ordre de 10  $\mu\text{m}$  à 20 $\mu\text{m}$ .

REVENDICATIONS

1.- Procédé d'obtention de particules solides à partir d'au moins un produit hydrosoluble, caractérisé en ce qu'il  
5 comporte les étapes consistant à :

- mettre en solution ledit produit au sein d'une phase aqueuse,
- réaliser une émulsion, ou une micro-émulsion, constituée de ce mélange aqueux et d'une phase organique  
10 polaire,
- mettre en contact cette émulsion, ou cette micro-émulsion, avec un fluide à pression supercritique, ou un gaz liquéfié, de façon que celui-ci extrait la phase organique et l'eau, provoquant ainsi la précipitation de  
15 particules solides constituées du produit hydrosoluble,
- recueillir les particules ainsi formées.

2.- Procédé suivant la revendication 1 caractérisé en ce que la phase aqueuse et/ou la phase organique contient en solution au moins un agent de revêtement.

20 3.- Procédé suivant l'une des revendications 1 ou 2 caractérisé en ce que l'émulsion ou la micro-émulsion est du type eau/huile.

4.- Procédé suivant l'une des revendications 1 ou 2 caractérisé en ce que l'émulsion ou la micro-émulsion est  
25 du type huile/eau/huile.

5.- Procédé suivant l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que le fluide à pression

supercritique, ou le gaz liquéfié, est du dioxyde de carbone.

6.- Procédé suivant l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que le fluide à pression supercritique, ou le gaz liquéfié, est du protoxyde d'azote.

7.- Procédé suivant l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que le fluide à pression supercritique, ou le gaz liquéfié, est du diméthyléther.

8.- Procédé suivant l'une des revendications 5 à 7 caractérisé en ce que le fluide à pression supercritique est constitué d'un mélange d'au moins deux des gaz : dioxyde de carbone, protoxyde d'azote, diméthyléther.

9.- Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le solvant organique polaire est un alcool ayant entre 3 et 10 atomes de carbone, et de préférence entre 4 et 7 atomes de carbone, ou un ester formé à partir d'un acide carboxylique et d'un alcool ayant au total entre 5 et 12 atomes de carbone, ou une cétone ayant entre 5 et 8 atomes de carbone.

10.- Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le produit hydrosoluble est constituée d'au moins un principe actif, d'intérêt alimentaire, pharmaceutique, cosmétique, agrochimique ou vétérinaire.

11.- Procédé suivant l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le produit hydrosoluble est constitué

d'au moins une protéine, ou d'un mélange de cette protéine avec un agent de stabilisation.

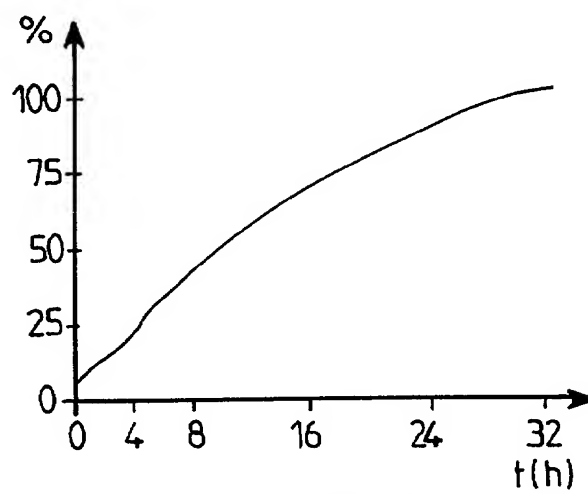
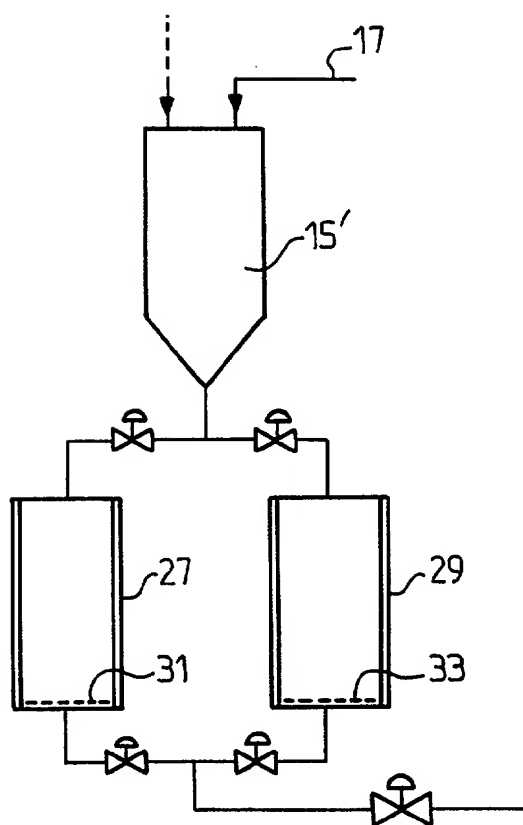
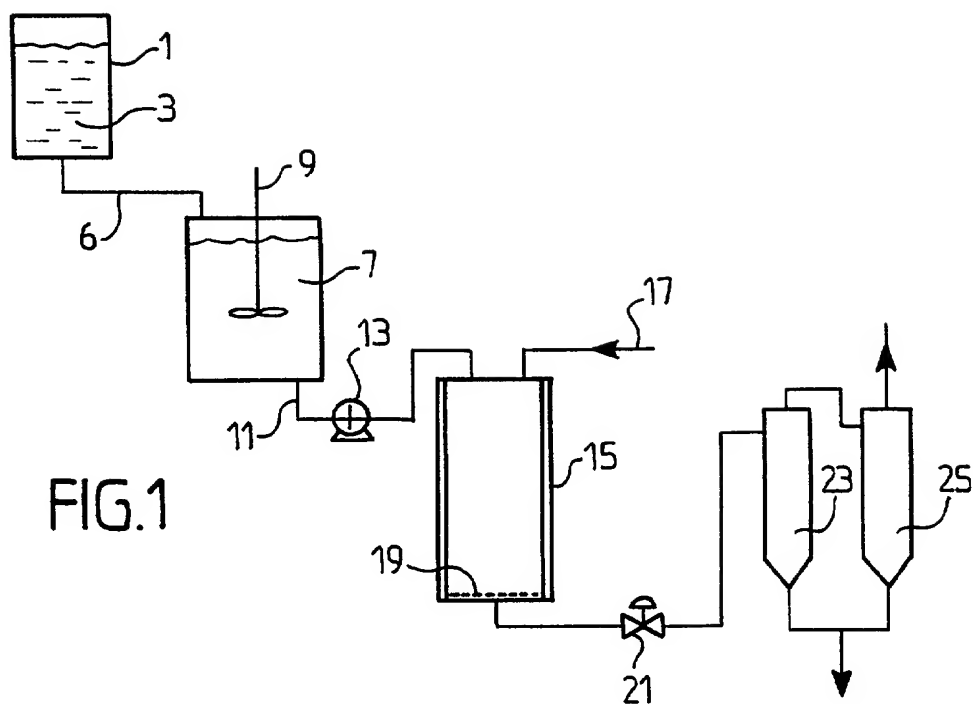
12.- Procédé suivant l'une des revendications 2 à 11, caractérisé en ce que l'agent de revêtement est constitué  
5 d'au moins un polymère du type utilisé dans les industries pharmaceutiques ou cosmétiques.

13.- Procédé suivant l'une des revendications 2 à 11 caractérisé en ce que l'agent de revêtement est constitué d'au moins un lipide du type utilisé dans les industries  
10 pharmaceutiques ou cosmétiques.

14.- Procédé suivant l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'on réalise :

- une alimentation en continu dans une enceinte (15'), d'une part du fluide à pression supercritique ou du gaz  
15 liquéfié et, d'autre part, de l'émulsion ou de la micro-émulsion et,

- un soutirage en continu de cette enceinte (15') du fluide contenant les particules.





2/2

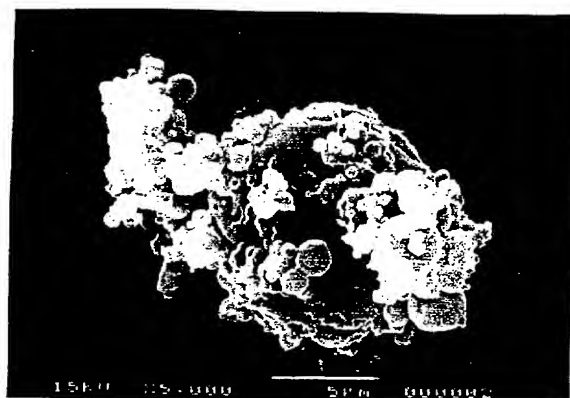


FIG.3

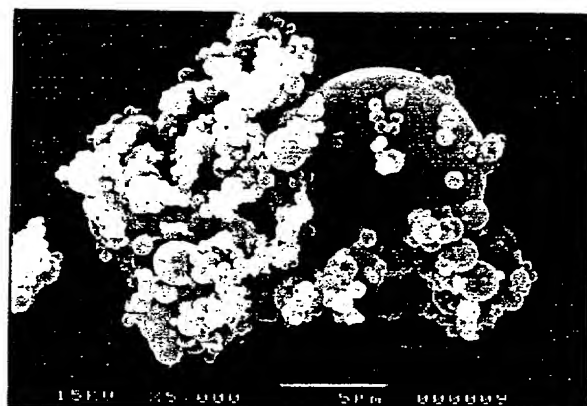


FIG.4

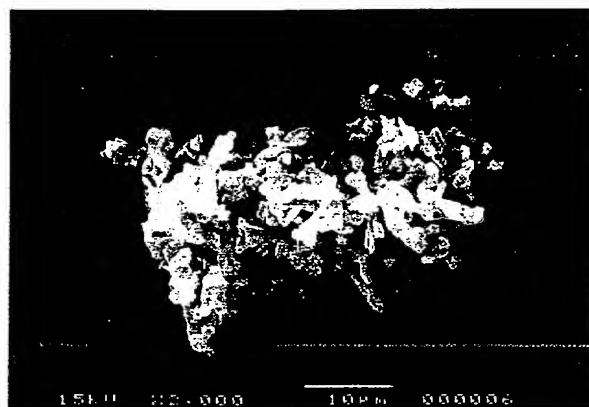


FIG.6



2824754

# **RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 603272  
FR 0106403

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	DE 199 04 990 A (FRAUNHOFER GES FORSCHUNG) 27 avril 2000 (2000-04-27) * colonne 1, ligne 66 - colonne 3, ligne 23 *	1,5, 9-11,14	B01J2/06 B01J13/12 B01J3/00 A61K9/16
A	US 5 639 441 A (KARST UWE ET AL) 17 juin 1997 (1997-06-17) * revendications 1-32 *	1-14	
A	WO 00 67892 A (GLAD HAAKAN ;ASTRAZENECA AB (SE); BOISSIER CATHERINE (SE)) 16 novembre 2000 (2000-11-16) * revendications 1-22 *	1-14	
D,A	WO 95 01221 A (HANNA MAZEN ;UNIV BRADFORD (GB); YORK PETER (GB)) 12 janvier 1995 (1995-01-12) * le document en entier *	1-14	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
			B01J A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
4 février 2002		Cubas Alcaraz, J	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE****RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0106403 FA 603272**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 04-02-2002

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
DE 19904990 A	27-04-2000	DE 19904990 A1	27-04-2000
US 5639441 A	17-06-1997	US 5301664 A	12-04-1994
		EP 1160018 A2	05-12-2001
		EP 0677332 A2	18-10-1995
		US 6095134 A	01-08-2000
		AT 158716 T	15-10-1997
		AU 3726193 A	05-10-1993
		CA 2131393 A1	16-09-1993
		DE 69314326 D1	06-11-1997
		DE 69314326 T2	09-04-1998
		EP 0627910 A1	14-12-1994
		MX 9301246 A1	01-09-1993
		WO 9317665 A1	16-09-1993
WO 0067892 A	16-11-2000	AU 4792300 A	21-11-2000
		WO 0067892 A1	16-11-2000
WO 9501221 A	12-01-1995	AT 174530 T	15-01-1999
		AU 677345 B2	17-04-1997
		AU 7007194 A	24-01-1995
		CA 2166301 A1	12-01-1995
		DE 69415320 D1	28-01-1999
		DE 69415320 T2	24-06-1999
		DK 706421 T3	23-08-1999
		EP 0706421 A1	17-04-1996
		ES 2128564 T3	16-05-1999
		WO 9501221 A1	12-01-1995
		GR 3029612 T3	30-06-1999
		JP 8511987 T	17-12-1996
		NZ 267697 A	26-05-1997
		SG 47392 A1	17-04-1998
		US 5851453 A	22-12-1998